



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO  
DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

*DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES UTILIZANDO  
ELETRODOS DE ITO MODIFICADO COM POLI (2-VINIL  
PIRIDINA)*

**TAMARA RODRIGUES TORRES ADIB ANTONIO**

**BOTUCATU-2012**

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES UTILIZANDO  
ELETRODOS DE ITO MODIFICADO COM POLI (2-VINIL  
PIRIDINA)***

**TAMARA RODRIGUES TORRES ADIB ANTONIO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Botucatu, para obtenção do grau de Física Médica.

**Orientador: Valber de Albuquerque Pedrosa**

**Departamento de Química e Bioquímica**

**BOTUCATU-2012**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
CÂMPUS DE BOTUCATU

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

TAMARA RODRIGUES TORRES ADIB ANTONIO

### ***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES UTILIZANDO ELETRODOS DE ITO MODIFICADO COM POLI (2-VINIL PIRIDINA)***

Relatório final aprovado como requisito para obtenção de créditos na disciplina Estágio Curricular do curso de graduação em Física Médica do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, pelos seguintes examinadores:

---

Orientador: Prof. Dr. Valber de Albuquerque Pedrosa  
Departamento de Química e Bioquímica.

---

Prof. Dr. Vladimir Eliodoro Costa  
Departamento de Física e Biofísica.

## RESUMO

Há uma grande expectativa para o desenvolvimento de biossensores miniaturizados, que permitam análises mais eficientes e rápidas, em matrizes complexas como as encontradas: no ar, alimentos, águas residuais e em medicamentos. Recentemente, filmes poliméricos inteligentes ativados por estímulo externo têm atraído bastante interesse no desenvolvimento desses tais nanosensores para uso em sistemas químicos e bioquímicos. Estes materiais apresentam uma alta sensibilidade a alterações físicas ou químicas ocorridas na sua interface, e respondem seletivamente a essas mudanças para se adaptarem ao meio. Juntando-se as propriedades estímulo-responsivas desses polímeros com a alta seletividade de reações biológicas tem-se uma excelente combinação para a criação de nano biossensores.

A esse tipo de sistema: interfaces/material biológico adota-se a nomenclatura biointerface. As biointerfaces são biossensores em potencial, e na preparação dos biossensores a tarefa mais complicada na sua preparação é o desenvolvimento de superfícies adequadas para o interfaceamento com material biológico, de maneira que a parte biológica possa atuar de forma sensível e estável.

A primeira etapa consistiu na produção e caracterização dos polímeros escova (P2VP), os quais serão preparados pelo processo de deposição térmica. A caracterização dos mesmos foi realizada por imagens microscopia de força atômica (AFM), via eletroquímica e por transmissão de ressonância plasmônica de superfície. Na etapa posterior foi estudada a imobilização da glicose oxidase para a preparação do biossensor. O dispositivo fabricado foi empregado para a determinação direta de glicose. Desta forma, esperou-se obter uma metodologia de menor custo e tempo de análise. Logo, este estudo irá contribuir de forma significativa sobre os processos de montagem de biossensores a partir de compostos nanoestruturados. Foram utilizadas técnicas de cronoamperometria e voltametria cíclica para estudos sobre a aplicabilidade das biointerfaces na determinação direta do analito de interesse.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	5
2. METODOLOGIA .....	8
2.1. Reagentes .....	8
2.2. Desenvolvimento do eletrodo .....	9
2.2.1. Modificação do eletrodo .....	9
2.3. Imobilização da enzima sobre o eletrodo .....	10
2.4. Medidas eletroquímicas .....	10
2.5. Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) .....	10
2.6. Medidas AFM .....	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	12
4. CONCLUSÃO .....	19
REFERÊNCIAS .....	20

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de sensores miniaturizados pode ser feita a partir de respostas estímulo-responsivas de polímeros escovas combinadas com a alta seletividade de sistemas biológicos. Esta é uma metodologia bastante promissora que se utiliza de filmes finos poliméricos para o desenvolvimento desses sensores, um meio simples e econômico de transdução [1]. Também chamados materiais inteligentes, os citados filmes finos poliméricos são materiais que possuem propriedades físico-químicas sensíveis a estímulos externos - como variação de temperatura, aplicação de um determinado comprimento de onda, força mecânica, potencial elétrico, força magnética, pH e composição química e às interações com um analito de interesse [2,3,4,5].

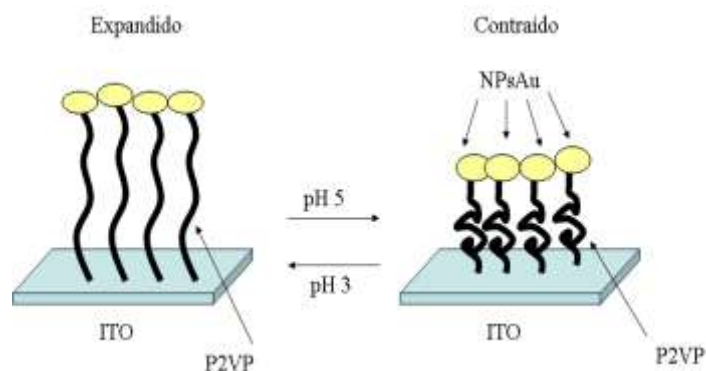
Os polímeros convencionais estão em praticamente tudo o que usamos atualmente: tecidos, medicamentos, embalagens, meios de transporte, comunicações, armazenamento de informações etc. Existem em três grandes classes; homopolímeros, copolímeros e blendas. Os homopolímeros são constituídos de um único tipo de meros (unidades iguais que se repetem ao longo da cadeia polimérica) e os copolímeros, de dois ou mais meros diferentes. Já as blendas são obtidas pela mistura de um ou mais homo ou copolímeros distintos, produzindo um terceiro material polimérico com propriedades diferentes dos seus componentes isolados.

Filmes finos poliméricos (polímero escova) podem ser fabricados por deposição sobre ITO (óxido de estanho dopado com índio), um substrato altamente condutor e transparente na região visível do espectro eletromagnético que possui uma ótima estabilidade química. ITO é muitas vezes usado para fazer revestimentos condutores transparentes para exposições, tais como telas de cristal líquido, displays de tela plana, displays de plasma, painéis de toque, e aplicações de tinta eletrônica. É também utilizado para vários revestimentos ópticos, mais notavelmente infravermelho refletindo revestimentos (espelhos quentes) para automóveis, óculos e sódio lâmpada de vapor. Outros usos incluem sensores de gás e revestimentos anti-reflexo.

Polímero escova é um dos tipos mais eficientes de filme fino com propriedades estímulo-responsivas para o desenvolvimento de nanosensores, pois sua topologia apresenta características de dilatação e contração não encontradas em outras estruturas [6,7]. Essas mudanças conformacionais na sua estrutura têm levado a um aumento da sensibilidade para detecção de alguns compostos [8,9,10]. Há diversos parâmetros que foram testados para controlar tais propriedades: densidade dos compostos, comprimento

das cadeias poliméricas, dispersidade e composição química dos grupos funcionais. O polímero escova pode ser controlado por interações eletrostáticas que afetam fortemente as propriedades físico-químicas do filme através da repulsão mútua entre as cargas dos polímeros e a pressão osmótica presente nos contra íons das escovas. Também, pode sofrer alterações conformacionais causadas por determinados estímulos externos. A variação de pH, força iônica ou mudança de polaridade do solvente são exemplos de estímulos que podem afetar a configuração de tais polímeros [11]. Por isso, é necessário criar uma interface comutável que altera a permeabilidade do polímero a fim de regular os processos eletroquímicos que venham a ocorrer por mudanças no meio.

A mudança conformacional acarreta dilatação ou contração do filme, alterando sua permeabilidade em relação à passagem de corrente. Quando a estrutura está dilatada, há livre circulação de elétrons, mas se contraída, pelo contrário, dificulta a sua passagem (Figura 1). Este fenômeno pode ser analisado a partir das medidas eletroquímicas por voltametria cíclica e por espectroscopia de impedância eletroquímica.



**Figura 1:** Representação da superfície do polímero alterando seu estado conformacional conforme a mudança de pH.

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência deste método resulta de sua habilidade de rapidamente fornecer dados sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos.

Esta técnica eletroanalítica baseia-se nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície. É classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ( $i > 0$ ) que, por sua vez, é medida em função da aplicação

controlada de um potencial. Assim, as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge no eletrodo de trabalho ao se aplicar um potencial entre um eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar. O parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i). O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma, e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e, conseqüentemente, na cela eletroquímica.

Inicia-se a aplicação do potencial de um valor no qual nenhuma redução ocorre e, com o aumento deste para regiões mais negativas (catódica) sucede a diminuição do composto em solução, gerando um pico de corrente proporcional à concentração deste composto. Quando o potencial já tiver atingido um valor no qual nenhuma reação de redução ocorre, o mesmo é varrido no sentido inverso, até o valor inicial, e no caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados, gerando um pico simétrico ao de redução. O tipo de voltamograma gerado depende do mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos.

Já a impedância eletroquímica é uma técnica não estacionária que emprega sinais de pequena amplitude para perturbar um determinado potencial ou uma determinada corrente aplicada num sistema eletroquímico. A utilização destes sinais permite uma análise linear dos resultados que são fornecidos na forma senoidal, podendo diferir do sinal aplicado em fase e amplitude. A impedância pode então ser definida como a medida da diferença de fase e de amplitude decorrente da perturbação, ou em outras palavras, como sendo a relação entre uma perturbação do potencial  $\Delta E$  e a resposta em variação de corrente  $\Delta I$ .

Logo, os esforços desse trabalho de conclusão de curso foram concentrados para o desenvolvimento de biossensores que respondam a estímulos externos e baseados na utilização de polímeros escovas. Os biossensores aqui desenvolvidos foram caracterizados pelas técnicas de: UV-vis, Microscopia de Força Atômica e por técnicas eletroquímicas. Os mesmo foram utilizados para a detecção de glicose e apresentaram ótimos resultados quando comparados a outros biossensores encontrados na literatura.



## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Reagentes

Os reagentes utilizados no experimento estão apresentados na tabela abaixo, juntamente com as indicações de seus respectivos pesos moleculares e suas procedências.

**Tabela 1:** Lista de reagentes com seus respectivos pesos moleculares e suas procedências.

Material	Peso Molar	Procedência
Álcool etílico absoluto	46,07	Sigma-Aldrich
2-Butanona		Sigma-Aldrich
Tolueno	92,14	Chemis
3-Glicidoxipropiltrimetoxissilano	236,34	Sigma-Aldrich
Hidróxido de amônio	35,05	J.T.Baker
Peróxido de Hidrogênio	34,01	Vetec
Cloreto de Potássio	74,555	Carlo Erba
Ácido Clorídrico	36,46	Sigma-Aldrich
Poli (2-vinil piridina)	10800	PolymerSource Inc.
Cloridrato de ouro (III) trihidratado	258,03	Sigma-Aldrich
Citrato de sódio	294,10	Sigma-Aldrich
Glicose oxidase		Sigma-Aldrich
1,2-Dicloroetano	98,96	Sigma-Aldrich
N-Hidroxisuccinimida	115,09	Sigma-Aldrich

O tampão fosfato pH 7,0 foi preparado com ácido fosfórico e monohidrogeno fosfato dissódico na concentração de  $10 \times 10^{-3}$  mol/L. O pH foi ajustado conforme o necessário com NaOH 1 mol/L ou com  $H_3PO_4$  1 mol/L. Todas as soluções foram preparadas com água purificada, em sistema Milli-Q, procedência Millipore Corporation.

#### Preparação da solução de ouro coloidal

Aqueceu-se até a ebulição 100,0 mL de uma solução  $2,5 \times 10^{-4}$  mol/L de  $HAuCl_4$  em um Erlenmeyer, com agitação. Adicionou-se rapidamente 5,0 mL de

solução 1% de citrato de sódio e manteve-se a solução em ebulição, por 10 min, ainda sob agitação. Decorrido esse tempo, o aquecimento do sistema foi suspenso e a agitação mantida por mais 15 min em outra placa de agitação, porém sem aquecimento. A barra magnética foi, então, removida e a solução foi resfriada à temperatura ambiente sem a utilização de banho de gelo. Obteve-se imediatamente o espectro eletrônico da suspensão resultante.

## **2.2 Desenvolvimento do eletrodo**

O primeiro passo foi cortar o ITO em pedaços de 1,0 mm de largura e 3,0 mm de comprimento, tamanho este adequado para que possam ser realizadas as medidas eletroquímicas. Após esta primeira etapa os mesmos foram imersos em álcool absoluto e deixados no ultrassom por 5 min para esterilização. Posteriormente, foram lavados com água Milli-Q e imersos em uma solução contendo butanona para completa remoção de material orgânico presente, por mais 5 minutos. Após os 5 min os eletrodos foram lavados novamente com água Milli-Q. Foram então inseridos em um terceiro béquer para mais uma etapa de limpeza numa solução contendo: 6 mL de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), 8 mL de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e 6 mL de água Milli-Q, por 30 minutos. Transcorrido o tempo, os eletrodos foram lavados em água Milli-Q por 20 min, e em seguida secados no nitrogênio.

### **2.2.1 Modificação do eletrodo**

Os eletrodos foram quimicamente modificados com P2VP, de acordo com o procedimento que será descrito a seguir:

- Os eletrodos foram modificados em uma solução contendo 1% de 3-3-Glicidoxipropiltrimetoxissilano (GPS) em tolueno, por 12 horas à temperatura ambiente. Após esta etapa, foram lavados com tolueno para remover o excesso de GPS que não reagiu.
- Adicionou-se então 60  $\mu\text{L}$  do polímero P2VP (solução de 0,01 % em butanona) às superfícies dos ITOs, para se obter um filme fino. A reação dos polímeros com o GPS foi feita no forno a vácuo 1 bar, à temperatura de 140° C por 5 horas. Passado esse tempo, os eletrodos foram lavados com butanona para retirar os polímeros não ligados.

- Após a etapa de modificação com polímero, foram depositadas nanopartículas de ouro coloidal sob as superfícies dos eletrodos por 5 horas. Decorridas as horas, os eletrodos foram lavados com água Milli-Q para retirar o excesso de ouro.

### **2.3 Imobilização da enzima sobre o eletrodo**

Após as etapas acima os eletrodos foram mergulhados em uma solução de MUA 10 mmol/L por um período de 12 horas. Logo em seguida, os eletrodos ficaram imersos na solução de tampão de fosfato (10 mmol/L, pH 5,5) que continha 0,4 mol de EDC(1,2-Dicloroetano) e 0,1 mol de NHS(N-Hidroxisuccinimida), por 2 horas com agitação contínua, e então adicionou-se 100 µL da solução de GOx (10 mg/mL em 10 mmol/L de PBS e pH 6,0) por período 12 horas à temperatura ambiente.

### **2.4 Medidas eletroquímicas**

Para a realização das medidas eletroquímicas de voltametria cíclica e por impedância utilizou-se uma célula eletroquímica composta por três eletrodos: eletrodo modificado como eletrodo de trabalho, eletrodo de referência Ag/AgCl e contraeletrodo de platina.

Nesta célula, colocou-se uma solução de 20 mL de KCl de concentração 0,1 mol e variou-se o pH da mesma com adição de HCl. Foram obtidos voltamogramas cíclicos antes e durante a modificação em  $K_4Fe(CN)_6/K_3Fe(CN)_6$   $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L para a observação do comportamento do eletrodo de ouro em função da modificação. Também foram realizados estudos por voltametria cíclica utilizando os eletrodos modificados em diferentes valores de pH para verificar o comportamento dos mesmos com relação ao pH do meio.

Todas as medidas eletroquímicas foram obtidas utilizando a interface µAutolab III/ FRA 2 .Para a medida de voltametria cíclica, empregou-se o software GPES 4.9 e para a de impedância o software FRA 4.9.

### **2.5 Espectroscopia de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis)**

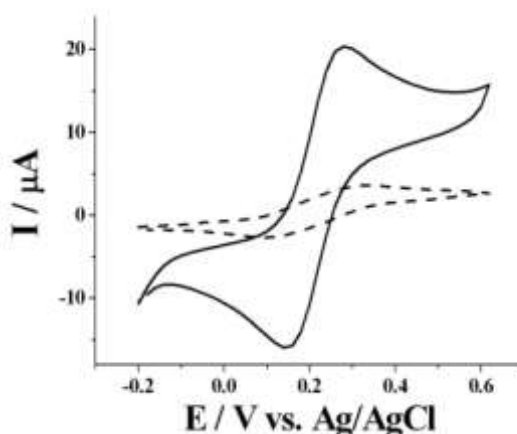
Para as medidas de espectroscopia UV-Vis, foram inseridos eletrodos em cubetas contendo soluções com pH variando de 2 à 7. Estas, por sua vez, foram colocadas no espectrômetro e as medidas foram registradas pelo software Acquire Toolbar.

## **2.6 Medidas AFM**

As imagens de AFM foram obtidas no laboratório do Grupo de Materiais Eletroquímicos e Métodos Eletroanalíticos do IQSC / USP, utilizando-se um equipamento TMX 1010 Explorer da Topometrix operando no modo contato.

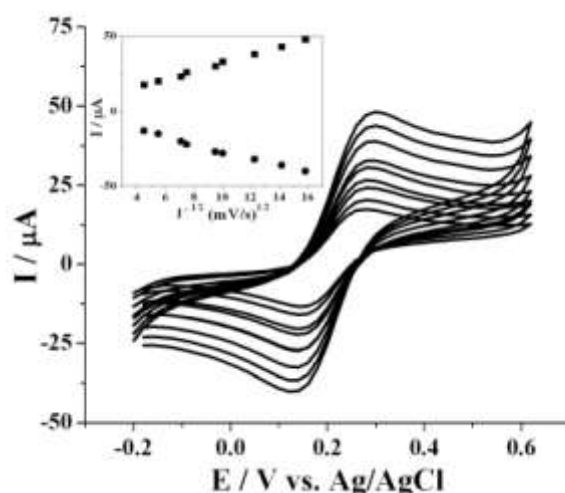
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A primeira etapa do projeto consistiu em avaliar o comportamento do sensor modificado em diferentes pH. Devido a alteração do pH, uma mudança brusca ocorre na carga de superfície do polímero escova. O experimento foi inicializado com pH 3,8, quando o polímero escova P2VP estava protonado, pois se trata de um polímero de carga positiva, permeável às espécies redox solúveis carregadas negativamente FCMA 0,5 mmol/L. A Figura 2 mostra a voltametria cíclica (VC) do par redox e o resultado apresentou um perfil voltamétrico com dois picos, um no potencial anódico em torno de 0,26 V e o outro no potencial catódico em 0,16 V. O que demonstra que as respostas das espécies redox conseguem atravessar a estrutura polimérica e confirmam o estado ON do eletrodo. Também foi realizado o mesmo experimento em pH 6,0 e curva voltamétrica está mostrada na Figura 2 (curva tracejada). Como podemos comparar com o resultado obtido sobre o pH 3,8 existe uma diminuição da corrente e um menor deslocamento do potenciais redox. O que confirma que o polímero P2VP está em um estado OFF e inibe o processo de transferência de elétrons para a espécie redox em solução (logo ele se contrai e dificulta a passagem de elétrons). A mudança observada é reversível e reproduzível entre estados inativos e ativos do eletrodo modificado com P2VP. Logo, podemos concluir que com pH 3,8 o polímero expande-se e permite a acessibilidade eletroquímica para grupos redox, e com o pH maior que 6,0 o mesmo se contrai impedido tal mecanismo. Esse fenômeno é o que atribui ao material o nome de material inteligente, pois o polímero muda a sua conformação de acordo com o estímulo recebido.



**Figura 2:** Voltametria cíclica obtida para o eletrodo modificado P2VP na presença de 0,5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ , com velocidade de varredura de 50 mV/s.

Também foi estudado o efeito da variação da velocidade por voltametria cíclica. A Figura 3 mostra a separação dos picos obtidos por VC no sensor. Como podemos notar, a corrente aumenta proporcionalmente com o aumento da velocidade de varredura. Observa-se que os picos das correntes são proporcionais à raiz quadrada das velocidades de varredura. Esta é uma característica de processos regulados por controle difusional que confirmou ainda mais que as espécies redox não estão restritas à esfera deste sensor.

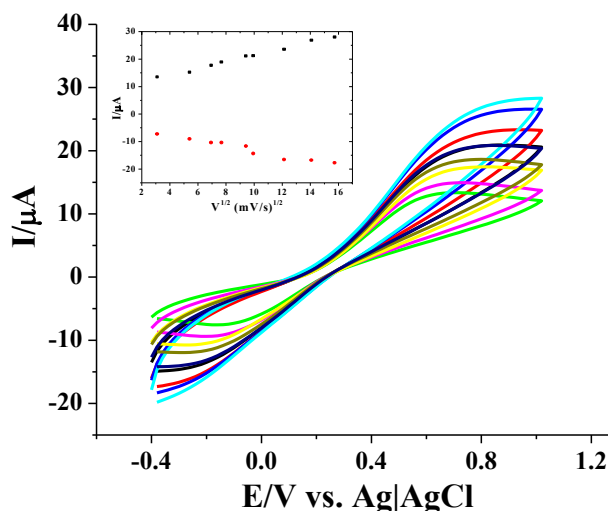


**Figura 3:** Voltametria cíclica do eletrodo modificado P2VP obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura (10-250 mV/s). As medidas foram realizadas em solução de KCl pH 3,8, na presença de 0,5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ . No inserte da figura: nota-se a dependência do pico de corrente em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura.

Assim como observado para o pH 3,8, também foram efetuadas medidas em pH 6,0, pois nesse pH o polímero se encontra no estado OFF, contraído, onde os movimentos das cadeias estão “congelados”, restringindo os processos eletroquímicos. Este fato é confirmado mediante a inibição do processo de transferência de elétrons para a espécie redox em solução na Figura 4.

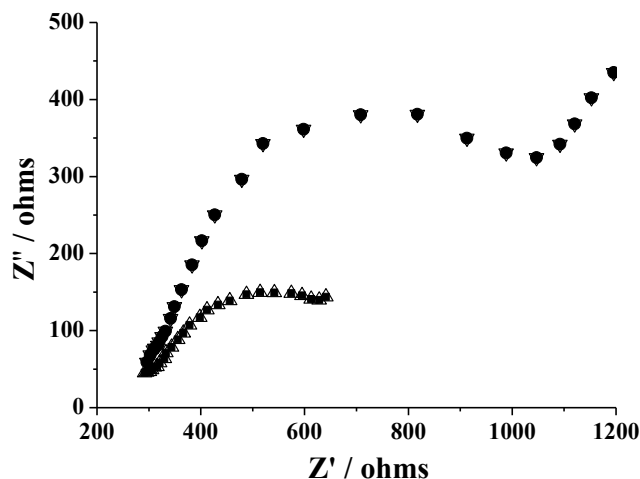
Comparadas as Figuras 3 e 4, podemos notar que há uma diminuição gradativa da corrente de pico entre os pH 3,8 e pH 6,0. Assim, comprova-se que, para pH mais ácido as nanopartículas estão separadas umas das outras e o polímero expandido, facilitando a passagem de corrente e, conseqüentemente, obtém-se um pico maior. Já

com o aumento do pH há uma diminuição da corrente de pico devido a contração do polímero com a consequente agregação das nanopartículas.



**Figura 4:** Voltametria cíclica do eletrodo modificado P2VP obtido sob aplicação de diferentes velocidades de varredura. As medidas foram em solução de KCl de pH 6,0, na presença de 0,5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ .

Ademais, foi estudado o efeito da resistência por impedância com a variação do pH. A Figura 5 apresenta o gráfico de Nyquist obtido (potencial fixo de 0,25 V vs Ag/AgCl) para diferentes pH. O gráfico da impedância para sensor exibiu um semicírculo para o pH 3,8. Pode-se notar que com o aumento do pH, há uma ampliação do semicírculo, indicando que há maior resistência para transferência eletrônica. O valor calculado para  $R_{et}$  eleva-se de 900 para 1600  $\Omega$  com o aumento do pH, provavelmente devido a desprotonação do polímero que intensifica a repulsão entre as cargas e leva a inibição da transferência eletrônica. Esta observação é similar à encontrada pela variação do pH na voltametria cíclica. A Figura 5 aponta que o processo de troca eletrônica entre o eletrodo e a espécie na solução é muito fácil em pH 3,8. Esta transferência eletrônica na interface origina da expansão do polímero escova induzido pelo pH e resulta na formação de canais iônicos. Quando o eletrodo modificado foi imerso no pH 3,8,  $R_{et}$  diminuiu novamente. O aumento e a diminuição do  $R_{et}$  podem ser repetidos várias vezes, o que confirma um processo reversível a expansão e contração do polímero.

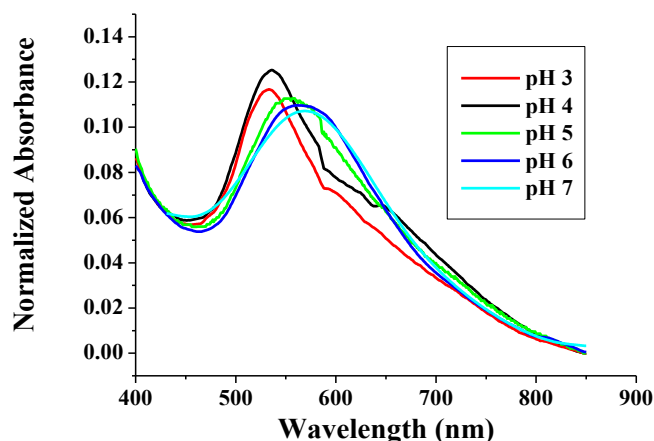


**Figura 5:** Gráfico de Nyquist para dados de impedância dos eletrodos modificados P2VP em tampão BPS de 10 mmol/L contendo 0,5 mmol/L  $K_4Fe(CN)_6$ . Dados experimentais obtidos em pH 3,8 passos 1 (●) e 3 (▼), e em pH 6,0 passos 2 (■) e 4 (Δ).

O segundo passo do projeto foi estudar o efeito plasmônico causado pela variação do pH. A Figura 6 mostra que com o aumento do pH houve a contração do polímero e a alteração da distância entre as nanopartículas que modulam a força de acoplamento plasmônico, o qual se manifesta como um aumento da banda no espectro de absorção do T-SPR. Podemos notar que conforme se eleva o pH da solução houve um deslocamento para maiores valores da banda de absorção. O pico de absorção máxima do espectro T-SPR do eletrodo P2VP para pH 3 e 7, mostrou uma diferença de 50nm, com deslocamento da banda plasmônica de 545 para 590 nm, respectivamente.

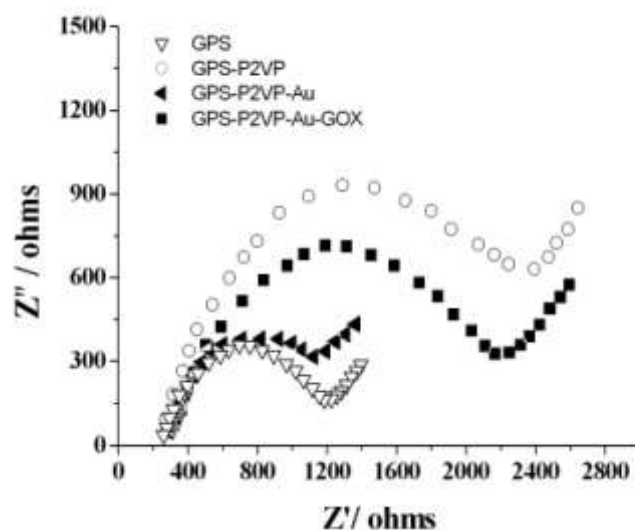
Notou-se também que pequenas mudanças no comprimento de onda são causadas pela contração ou expansão do polímero, e tais alterações conformacionais mostraram-se completamente reversíveis, pois as medidas foram realizadas várias vezes e os resultados ópticos foram idênticos.





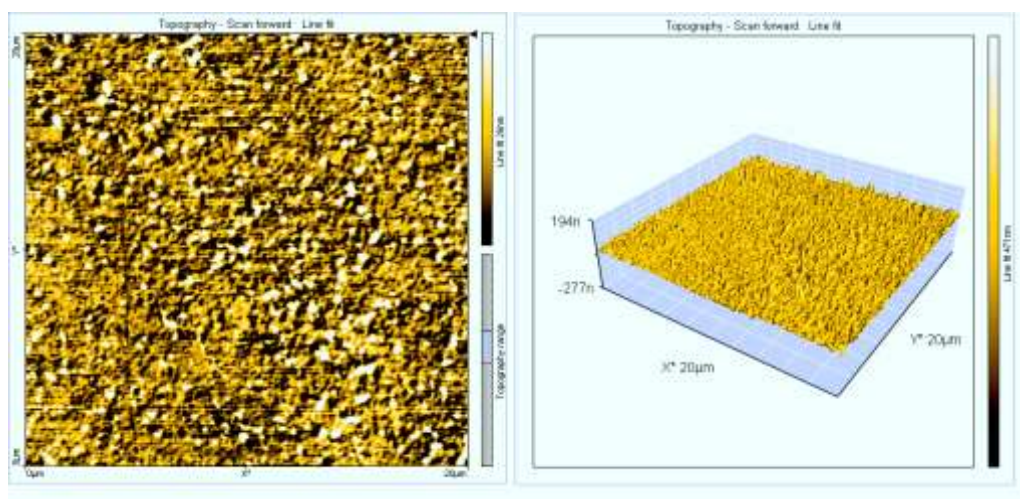
**Figura 6:** Espectro T-SPR do eletrodo modificado P2VP com adsorção de nanopartículas de ouro em sua superfície para valores de pH variando de 3 à 7.

O preparo do biossensor também foi monitorado em experimentos EIS (espectroscopia de impedância eletroquímica), um método eficaz para a sondagem de superfície modificada dos eletrodos. A Figura 7 expõe os resultados das medições da impedância apresentados como gráfico de Nyquist ( $Z''$  versus  $Z'$ ). Diferenças significativas nos espectros de impedância foram observadas durante silanização, deposição do polímero P2VP, fixação das nanopartículas de ouro, e posterior imobilização das enzimas. Esta figura mostra que a resistência dos eletrodos aumentou 0,9-3,0  $k\Omega$  depois da deposição polimérica. Uma descoberta interessante foi que a deposição da monocamada de ouro causou uma diminuição na resistência à transferência eletrônica de interface, a pH 3,8. As nanopartículas de ouro se incorporadas na escova P2VP inchada parecem fornecer locais adicionais para a reação eletroquímica, e efetivamente reforçar a transferência de elétrons através do mecanismo de elétrons esperando.

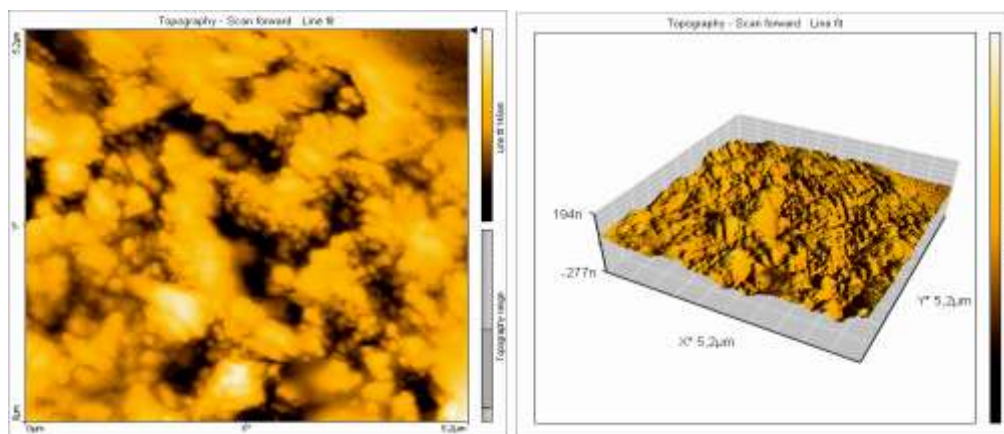


**Figura 7:** Gráfico de Nyquist para o eletrodo em  $0,5 \times 10^{-3}$  mol/L  $K_4Fe(CN)_6$  + 0,1 mol/L KCl pH 3,8.

A morfologia do sensor foi analisada por AFM. Na Figura 8 apresenta a morfologia do sensor antes do acoplamento da enzima. Pode-se notar que há o recobrimento total da superfície com nanopartículas de ouro. Já na Figura 9 pode-se notar o surgimento de estruturas maiores sobre as nanopartículas de ouro que caracterizam a deposição da enzima glicose oxidase sobre as mesmas.

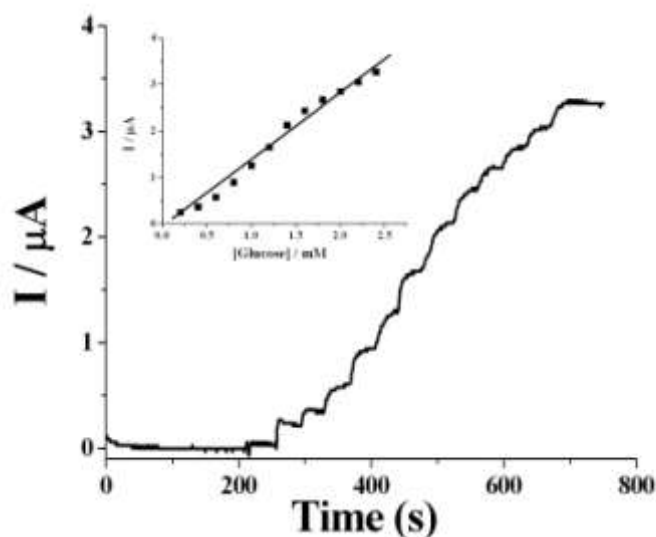


**Figura 8:** Micrografia da superfície do eletrodo recoberto com nanopartículas de ouro.



**Figura 9:** Micrografia da superfície do eletrodo recoberto com nanopartículas de ouro e posterior modificação da superfície com a enzima glicose oxidase.

Após a caracterização do biossensor, o próximo passo foi monitorar a resposta da oxidação da glicose no eletrodo P2VP-GOx por amperometria. A Figura 10 mostra a resposta amperométrica do eletrodo sensor. A curva de calibração da glicose vs. corrente revela que o biossensor de glicose tem sensibilidade de  $1,51 \mu\text{A mmol/L}$  com coeficiente de correlação de  $0,992$ . O limite de detecção foi definido como o valor do sinal três vezes acima do ruído e foi estimado em  $5,6 \times 10^{-6}$  mol de glicose.



**Figura 10:** Resposta amperométrica do biossensor P2VP-GOx para adições sucessivas de glicose de  $0,2 \text{ mmol/L}$  em tampão PBS de  $10 \text{ mmol/L}$  para um potencial aplicado de  $+0,26 \text{ V}$  vs eletrodo de referência  $\text{Ag/AgCl}$ , na presença de  $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol/L K}_4\text{Fe(CN)}_6$ .

#### 4. CONCLUSÃO

Este trabalho primeiro descreve o estudo da modificação da superfície do eletrodo ITO modificado com P2VP. O entendimento do que se passa na superfície do sistema eletrodo/solução é muito importante na construção de um biossensor. O P2VP demonstrou propriedades de propagação excelentes devido à regulação do transporte de íons através de domínios nanoscópicos e que são reversivelmente formadas no filme nanoestruturado em resposta a estímulos externos. Os sistemas descritos neste TCC representam uma matriz comutável/ajustável que pode ser controlada pelas mudanças no pH. Estes sistemas podem ser explorados em diversos sistemas bioquímicos como: dispositivos microfluídicos, biossensores e nas interfaces que controlam o acesso de produtos químicos para as interfaces reativas (por exemplo, em superfícies biocatalíticas de células de biocombustíveis). Já os resultados obtidos por impedância eletroquímica mostram que a deposição P2VP acarreta o aumento de resistência eletrodo/solução, porém após deposição de nanopartículas de ouro levou-se a sua diminuição. Também se nota que a variação do pH pode ressaltar numa maior resistência eletrônica em pH mais alto, que pode ser explicada pela conformação do polímero.

Após o entendimento do que se passa na superfície do sensor, foi desenvolvida uma metodologia para construção de um biossensor sobre a superfície polimérica do P2VP. O biossensor revelou-se com uma boa estabilidade, de fácil aplicabilidade e de baixo custo, sendo possível sua utilização como sensor eletroquímico em análises de glicose. Pode-se notar que a formação de biossensores pode ser uma excelente alternativa para análises de glicose, tendo como algumas vantagens a possibilidade de serem aplicados em amostras reais sem pré-tratamento ou separação prévia, com rapidez de análise e baixo custo.

## REFERÊNCIAS

- [1] TOKAREVA, I. et al. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. **J. Am. Soc.**, v.126, p.15950-15951, 2004.
- [2] AUROY, P.; AUVRAY, L.; LEGER, L. Characterization of the brush regime for grafted polymer layers at the solid-liquid interface. **Phys. Rev. Lett.**, v. 66, p.719-722, 1991.
- [3] ISRAELS, R.; LEERMAKERS, F. A. M.; FLEER, G. J. On the theory of grafted weak polyacids. **Macromolecules**, v.27, p.3087-3093, 1994.
- [4] ISRAELS, R. et al. Charged polymeric brushes-structure and scaling relations. **Macromolecules**, v.27, p. 3249-3261, 1994.
- [5] TAKEI, Y. G. et al. Dynamic contact-angle measurement of temperature-responsive surface-properties for poly (NIsopropylacrylamide) grafted surfaces. **Macromolecules**, v. 27, p. 6163-6166, 1994.
- [6] ALEXANDER, S. Adsorption of chain molecules with a polar head: a scaling prediction. **J. Phys. (Paris)**, v.38, p.983-987, 1997.
- [7] GENNES, P.-G. Conformations of polymers attached to an interface. **Macromolecules**, v.13, p.1069-1075, 1980.
- [8] ADVINCULA, R. C. et al. (Eds.). **polymer brushes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [9] LAUB, C. F.; KOBERSTEIN, J. T. Effect of brush polydispersity on the interphase between end-grafted brushes and polymeric matrices. **Macromolecules**, v.27, p.5016-5023, 1994.
- [10] ZHAO, B.; BRITTAIN, W. J. Polymer brushes: surface-immobilized macromolecules. **Prog. Polym. Sci.**, v.25, p.677-710, 2000.
- [11] BIESALSKI, M.; RUHE, J. Preparation and characterization of a polyelectrolyte monolayer covalently attached to a planar solid surface. **Macromolecule**, v.32, p.2309-2316, 1999.